

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент, к.б.н. Нипорко Олексій Юрійович
Протокол №____ засідання кафедри
від “__” _____ 2022 р.

**Дослідження впливу комплексу «ГАМК-рецептор- протеїнфосфатаза
PP2A» на регуляцію клітинного циклу у рослин та тварин**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»
Клюкова Павла Леонідовича

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н. **Самофалова Дарія Олексіївна**

Робота виконана під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», к.б.н Самофалової Д.О.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Клюков П.Л. Дослідження впливу комплексу «ГАМК-рецептор-протеїнфосфатаза» на регуляцію клітинного циклу у рослин та тварин. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

В роботі проведено пошук та аналіз послідовностей ГАМК рецептора та PP2A було встановлено наявність рослинних гомологів даних мішеней. Також проведено відбір просторових структур ГАМК рецептора та PP2A встановлених експериментально та встановлено спільні ризицільових мішеней. В результаті дослідження взаємодій на поверхні ГАМК було встановлено 4 можливі сайти для докінгу. Провівши аналіз баз даних хімічних речовин було показано наявність селективних та не специфічних інгібіторів ГАМК рецептора та PP2A.

Ключові слова: ГАМК, протеїнфосфатаза PP2A, регуляція, клітинний цикл.

Вступ

Наркотики, що викликають залежність, узурпують внутрішній механізм винагороди мозку, що призводить до компульсивної та деструктивної поведінки. У вентральній тегментальній області (VTA), центрі ланцюга винагороди мозку, ГАМКергічні нейрони контролюють збудливість нейронів проєкції дофаміну (DA) і є початком залежності від психостимуляторнозалежних змін у передачі сигналів. Попередня робота встановила, що вплив кокаїну/метамфетаміну збільшує активність білкової фосфатази 2A (PP2A), яка дефосфорилує субодиницю ГАМКВ2, сприяє інтерналізації рецептора ГАМКВ і призводить до меншого ГАМКВ-активованого G-білка, ректифікованого внутрішнього калію (GIRK). струми в нейронах VTA ГАМК. Як дії PP2A стають селективними для певного сигнального шляху, недостатньо зрозуміло. Тут ми демонструємо, що PP2A може безпосередньо асоціюватися з короткою пептидною послідовністю в C-кінцевому домені субодиниці ГАМКВ, і що ГАМКВ і PP2A знаходяться в безпосередній близькості в нейронах гризунів (миша/щур; змішана стаття). Ми показуємо, що цю взаємодію PP2A-ГАМКВ можна регулювати внутрішньоклітинним Ca²⁺. Нарешті, пептид, який потенційно зменшує залучення PP2A до ГАМКВ і тим самим обмежує дефосфорилування рецепторів, збільшує величину індукованих баклофеном струмів GIRK. Таким чином, обмеження PP2A-залежного дефосфорилування ГАМАВ може бути корисною стратегією для підвищення сигналізації рецепторів для лікування захворювань

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
Класифікація та будова ГАМК рецепторів.....	4
Будова ГАМК _A та ГАМК _C рецепторів.....	4
Будова ГАМК _B рецепторів.....	8
Посттрансляційні модифікації ГАМК рецепторів.....	9
Роль ГАМК рецептора в клітинному циклі.....	13
Селективні інгібітори ГАМК рецепторів та механізм їх дії.....	18
Клінічна дія ефекторів ГАМК рецепторів.....	20
 РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1 Матеріали дослідження.....	23
2.2 Біоінформаційний пошук та аналіз доменних структур.....	23
2.3 Аналіз доменної архітектури та структури протеїнфосфатаз.....	24
2.4 Відбір та аналіз якості матричних структур протеїнфосфатаз людини як потенційних матриць для моделювання.....	25
2.5 Пошук відомих інгібіторів PP2A та ГАМК.....	26
2.6 Біоінформатичні інструменти.....	26
 РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Пошук та аналіз послідовностей ГАМК рецептора та PP2A.....	28
3.2. Профільний аналіз доменної структури ГАМК рецептора та PP2A	29

3.3. Відбір та перевірка якості просторових структур ГАМК рецептора та PP2A встановлених експериментально.....	30
3.4. Дослідження особливостей взаємодій на поверхні ГАМК рецептора..	30
3.5. Пошук та аналіз відомих інгібіторів ГАМК рецептора і PP2A	32
3.6. Реконструкція структури комплексів ГАМК рецептора і PP2A з потенційними інгібіторами.....	32
ВИСНОВКИ	36
ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	37

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація та будова ГАМК рецепторів

Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) була вперше ідентифікована в мозку ссавців більше 50 років тому [1]. Це основний гальмівний нейромедіатор у мозку, локалізується приблизно в 30% синапсів центральної нервової системи (ЦНС). ГАМКергічна передача відіграє ключову роль у регуляції сну, а також пов'язана з тривогою, депресією, болем та епілепсією. Інгібуючий нейромедіатор ГАМК активує три основні класи рецепторів, які називаються ГАМК_A, ГАМК_B та ГАМК_C. Ці рецептори мають різні характеристики: рецептори ГАМК_A і ГАМК_C є іонотропним, тоді як рецептори ГАМК_B є метаботропними [2].

Спочатку було виявлено, що ГАМК активує чутливі до бікукуліну канали Cl⁻, а згодом була виявлена ГАМК-опосередкована активація катіонних каналів [3, 4]. Цей висновок привів до ідеї рецепторів ГАМК_A та ГАМК_B-типу, яка була введена в 1981 році Хіллом і Бауері [5]. Рецептор ГАМК_A безпосередньо зв'язує Cl⁻ і має модуляційні сайти зв'язування для бензодіазепінів, барбітуратів, нейростероїдів та етанолу (Рис. 1.1 а). Навпаки, ГАМК_B-рецептори з'єднуються з каналами Ca²⁺ і K⁺ через G-білки та системи вторинного повідомлення; вони активуються баклофеном і є стійкими до препаратів, які модулюють рецептори ГАМК_A [3,4].

1.2.Будова ГАМК_A та ГАМК_C рецепторів

Ранні дослідження Джонстона та його колег показали, що частково згорнутий аналог ГАМК цис-4-амінокротонової кислоти селективно активує третій клас ГАМК-рецепторів у ЦНС ссавців [6]. Ці рецептори, які були умовно

позначені як ГАМК_C у 1984 році, являють собою Cl⁻-пори, які нечутливі як до бікукуліну, так і до баклофену (Рис. 1.1 b).

ГАМК_A -рецептори — це ліганд-керовані хлоридні канали, які складаються з пентамерних комбінацій різних субодиниць. Всього в людини було ідентифіковано 19 генів субодиниці рецептора ГАМК_A, які кодують шість α (альфа1-6), три β (бета1-3), три γ (гамма1-3), три ρ (rho1-3) і один кожен з δ (дельта), ϵ (епсилон), π (пі) і θ (тета) (рис. 1А; таблиця 1) [8].

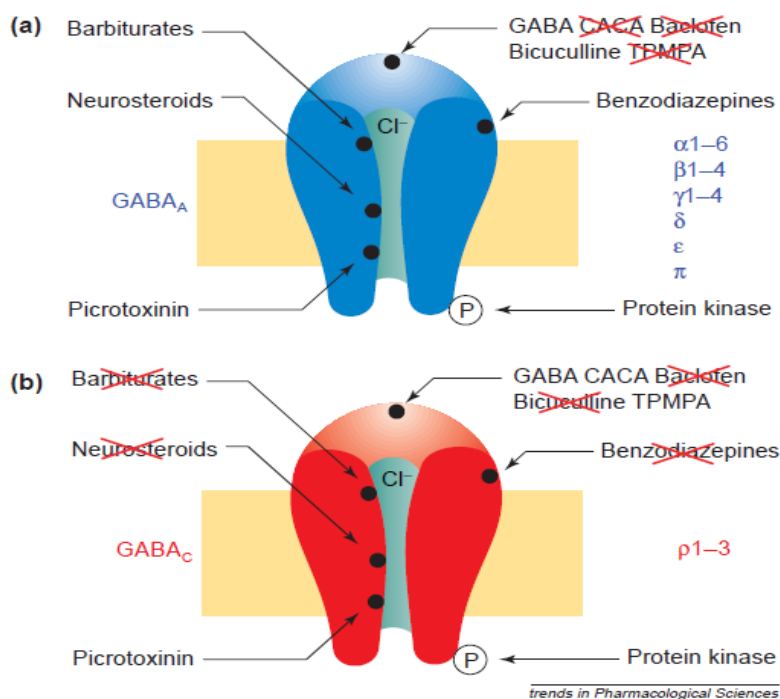


Рисунок 1.1 - Множинність іонотропних ГАМК-рецепторів. (а) Рецептор ГАМК_A має модулюючі ділянки зв'язування бензодіазепінів, барбітуратів і нейростероїдів. Реакції ГАМК конкурентно блокуються бікукуліном і неконкурентно — пікротоксином; вони модулюються внутрішньоклітинно протеїнкіназами, такими як протеїнкінази А і С. Агоніст рецептора ГАМК_C САСА (цис-4-амінокротонова кислота) і антагоніст ТРМРА [1,2,5,6-тетрагідропіридин-4 іл(метилфосфіновий кислота)] не впливають (червоні хрестики). (b) Рецептор ГАМК_C селективно активується САСА; він конкурентно блокується ТРМРА і неконкурентно — пікротоксином. Бікукулін, баклофен, а також ГАМК_A-модулюючі препарати неактивні щодо цього ГАМК-рецептора (адаптовано з [7])

Різноманітність ГАМК_A-рецепторів обумовлена альтернативним сплайсингом кількох генів [9]. Склад і розташування рецепторів впливають на його функціональні та фармакологічні властивості. Кожна субодиниця була ретельно досліджена з точки зору послідовності амінокислот, рівня експресії та локалізації в тканинах мозку, але досі неясно взаємодія між ними для утворення багатьох різних ізоформ [10].

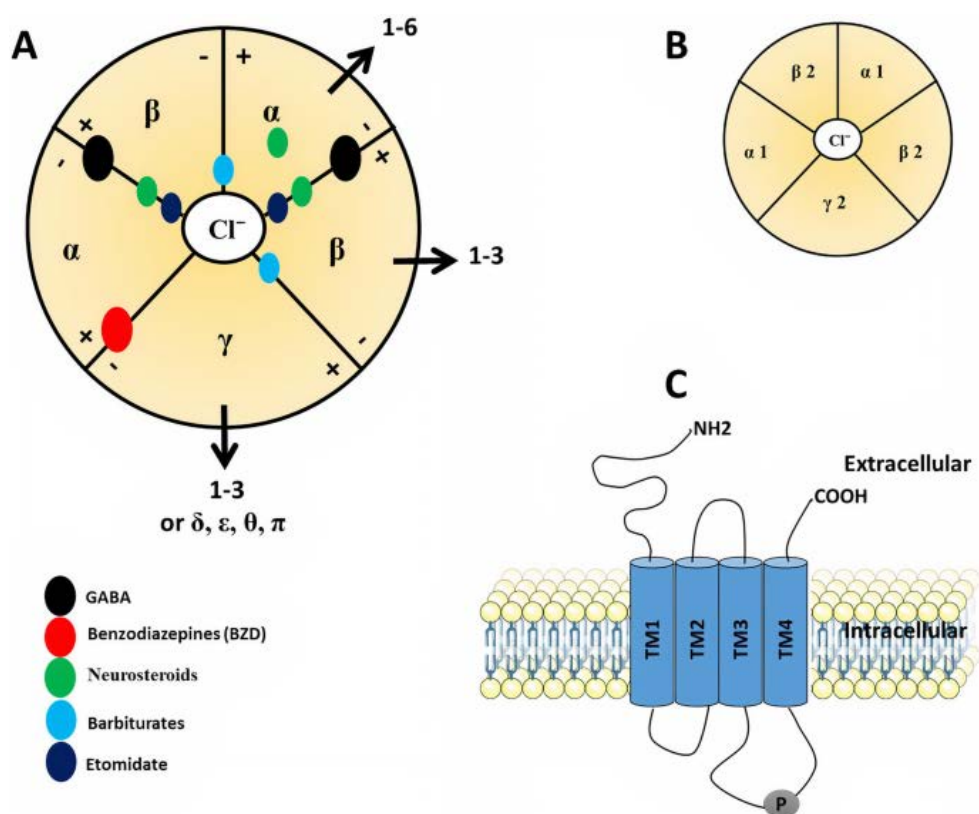


Рисунок 1.2 - Схематичне зображення структури рецепторів ГАМК.

ГАМК_A-рецептори є гетеропентамерами, які утворюють канал, проникний для іонів хлориду. Вони утворені 19 субодиницями: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π , $\rho 1-3$. (В) Найпопулярніша ізоформа ГАМК_{AR} складається з субодиниць $\alpha 1$, $\beta 2$ і $\gamma 2$, розташованих $\gamma 2\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1$ проти годинникової стрілки навколо центральної пори. (С) Зріла субодиниця містить великий гідрофільний позаклітинний N-кінець, чотири гідрофобні трансмембранні домени (TMD: TM1–TM4) і невеликий позаклітинний C-кінець

Ця різноманітність ізоформ може бути присутня навіть в одній клітині. Однак широко припускають, що основна ізоформа дорослої людини складається з субодиниць $\alpha 1$, $\beta 2$ і $\gamma 2$, які розташовані $\gamma 2\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1$ проти годинникової стрілки навколо центральної пори, якщо дивитися ззовні клітини (рис. 1.2B) [11]. ГАМК_A R субодиниці мають спільну структуру (рис. 1.2A). Зріла субодиниця складається з ~450 амінокислотних залишків. Вона містить N-кінцевий, великий гідрофільний позаклітинний домен (ECD), чотири гідрофобні трансмембранні домени (TMD: TM1–TM4), де TM2, як вважають, утворює пору хлоридного каналу, і внутрішньоклітинний домен (ICD) між TM3 і TM4, який є місцем білкових взаємодій та посттрансляційних модифікацій, які модулюють активність рецепторів (рис. 1.2C) [12]. Нейромедіатор ГАМК, а також психотропні препарати, такі як бензодіазепіни (BZD), зв'язуються з N-кінцем у місцях зв'язування α - β і α - γ інтерфейсів відповідно. З іншого боку, нейростероїди та анестетики, такі як барбітурати, знаходяться в TMD α і β субодиниць (рис. 1.2A) [13].

ГАМК_C-рецептори розглядаються як специфічний підтип рецепторів ГАМК_A через їх структурну гомологію, хоча вони відрізняються від рецепторів ГАМК_A за біохімічними, фармакологічними та фізіологічними властивостями [28]. Вони переважно експресуються в сітківці, де відіграють унікальну функціональну роль в обробці сигналів сітківки, але також експресуються по всьому мозку та на периферії [29]. ГАМК_C -рецептори беруть участь у численних процесах в ЦНС, включаючи зір, нюх, сон, пам'ять і когнітивні функції, секрецію гормонів і сприйняття болю, з багатообіцяючим потенціалом для лікування короткозорості, розладів сну, поліпшення пам'яті та навчання, страху і розлади, пов'язані з тривожністю.

Хоча розуміння ролі рецепторів ГАМК_C і процесів, що ініціюються взаємодією ліганд-рецептор у нейронах, все ще обмежене через відсутність адекватних фармакологічних засобів, певний прогрес був досягнутий після синтезу та фармакологічної оцінки селективних флуоресцентних і біотинілованих зондів для $\rho 1$ ГАМК_C рецепторів, які, сподіваємося, принесуть

нові знання про сайт зв'язування та гнучкість рецепторів ГАМК_C, а також стануть корисними інструментами для локалізації, візуалізації та вивчення фізіопатологічних процесів рецепторів ГАМК_C. У ссавців є три ізоформи ρ субодиниць (ρ_1 - ρ_3), які утворюють гомоолігомерні (утворені ізоформою ρ_1 , ρ_2 або ρ_3) або псевдогетеромерні (складаються з комбінації ізоформ ρ_1 і ρ_2 або ізоформ пентамеру ρ_2 і ρ_3) ГАМК_C [30]. У людини виражені лише дві ізоформи: ρ_1 і ρ_2 .

ГАМК_C -рецептори не чутливі ні до бікукуліну (характерний ліганд рецепторів ГАМК_A), ні до баклофену (характерний ліганд ГАМК_B -рецепторів). Вони більш чутливі до ГАМК, ніж ГАМК_A-рецептори, і для активації ГАМК-рецептора необхідні принаймні три молекули ГАМК [31]. При активації вони мають меншу хлоридну провідність, довший час відкриття каналів і менш легко десенсибілізують у присутності ГАМК, ніж ГАМК_A-рецептори. Бензодіазепіни та барбітурати не модулюють ГАМК_C -рецептори. Нейроактивні стероїди можуть модулювати ГАМК-індукований струм на рецепторах ГАМК_C, зокрема на каналах рецептора ρ_1 , як позитивним, так і негативним чином, хоча модуляція відбувається при відносно високих концентраціях нейроактивних стероїдів і є більш помітною за наявності низьких концентрацій ГАМК [32].

1.3.Будова ГАМК_B рецепторів

Рецептори ГАМК_B є членами сімейства рецепторів, пов'язаних з білком G класу C (GPCR). GPCR зазвичай поділяють на чотири класи (A, B, C і F) на основі рівнів гомології послідовностей їх трансмембранних доменів [14], і клас A є найбільшим і найбільш вивченим GPCR. GPCR класу C складаються з метаботропних глутаматних рецепторів (mGluR), ГАМК_B -рецепторів, Ca²⁺D-чутливих рецепторів, смакових рецепторів, феромонних рецепторів та кількох орфанних рецепторів.

Рецептори ГАМК_B є прототиповими гетеродимерами субодиниць R1 і R2. Субодиниці рецептора ГАМК_B складаються з трьох доменів: довгого позаклітинного N-кінцевого домену, який називається доменом венериної мухоловки (VFT), який містить ортостеричний сайт зв'язування ГАМК; гептаспіральний трансмембранний домен (7TM); і C-кінцевий внутрішньоклітинний хвіст.

Було описано існування численних альтернативно сплайсованих варіантів субодиниць рецептора ГАМК_B [15]. Субодиниці R1 включають кілька варіантів сплайсингу, позначених як R1a, R1b, R1c, R1e, R1j, R1k, R1l, R1m і R1n. У ЦНС людини, двома основними варіантами сплайсингу є ізоформи R1a і R1b, які інтенсивно вивчалися і, як відомо, забезпечують молекулярне різноманіття рецепторів ГАМК_B [15]. Структурно ізоформи відрізняються за своїм N-кінцевим доменом, з парою доменів суші, присутніх в R1a (961aa). Домени суші були знайдені в кількох GPCR і можуть опосередковувати білкові взаємодії в широкому спектрі адгезійних білків. Ізоформа R1c має один домен суші і широко експресується в мозку [16]. Ізоформи R1e/g/h/i/j/l/m/n не мають 7 трансмембранних доменів, ні області з'єднання G-білка, ні C-кінцевий хвіст, тому вважають, що вони виділяються з клітин. Взявши разом, альтернативний сплайсинг субодиниці R1 забезпечує різноманітний спектр структурних і функціональних рецепторів ГАМК_B, і необхідні подальші дослідження, щоб зрозуміти фізіологічну роль цих ізоформ.

1.4. Посттрансляційні модифікації ГАМК рецепторів

Посттрансляційні модифікації (ПТМ) білків відіграють важливу роль у клітинних функціях. ПТМ — це ковалентне додавання певних функціональних груп до білків. Ідентифіковано понад 40 ПТМ, а також запропоновано їх зв'язок із такими захворюваннями, як рак та неврологічні розлади. Фосфорилування білка є найпоширенішим і найкраще вивченим ПТМ, при якому функція білка

регулюється у відповідь на позаклітинні стимули як всередині, так і поза нервовою системою [17]. Для регуляції фосфорилування білка необхідні протеїнкінази, протеїнофосфатази та субстратні білки. Фосфорилування бере участь майже в кожному клітинному процесі, воно модулює активність цільових білків у різних клітинних місцях і контролює активність сигнальних мереж. Фосфорилування білка досягається протеїнкіназами, які переносять фосфатну групу від аденозинтрифосфату (АТФ) до залишків серину, треоніну та/або тирозину цільового білка, і це можна повернути реакцією, яка називається дефосфорилуванням протеїновими фосфатазами.

Існує значний інтерес у розумінні ендогенних механізмів, які використовуються нейронами для регуляції функції ГАМК_A-рецепторів. Велика увага зосереджена на ролі фосфорилування рецепторів, оскільки спостерігається, що очищені препарати рецепторів фосфорилуються цАМФ-залежною протеїнкіназою (РКА) і протеїнкіназою С (РКС) [18]. Дослідження рекомбінантних рецепторів показали, що субодиниці рецепторів β і γ є субстратами для ряду протеїнкіназ. Зокрема, β -субодиниці фосфорилуються на консервативному залишку серину (Ser-409 або Ser-410) за допомогою РКС, РКА, Ca²⁺/Кальмодулінзалежної протеїнкінази (CaMKII) і цГМФ-залежної протеїнкінази [19-21]. Ser-408 також є субстратом РКА в субодиниці β 3. Рецептори ГАМК_A також є субстратами прототипової тирозинкінази SRC, яка переважно фосфорилує Tyr-365 і Tyr-367 у субодиниці γ 2 [22].

Наразі було ідентифіковано п'ять сайтів фосфорилування ГАМК_B рецепторів: серин 867 (S867) і S917/923 на субодиниці R; S783 і S892 на субодиниці R2 (Рис. 1.3). S867 на субодиниці R1 підлягає фосфорилуванню за допомогою кальцій/кальмодулін-залежної протеїнкінази II (CaMKII). Фосфорилування S867 сприяє ендоцитозу рецептора ГАМК_B, залежного від динаміну, особливо до рецепторів, які групуються з каналами GIRK.140) Фосфорилування S917/923 на субодиниці R1 і S783 на субодиниці R2 опосередковується 5ВАР-залежною протеїнкіназою [23]. АМРК діє як

енергетичний датчик для регулювання клітинного метаболізму і безпосередньо пов'язується з субодиниці R1 через залишки 910–925 в домені coiled-coil.

Дефосфорильовані ГАМК_B-рецептори зазнають опосередкованого клатрином ендоцитозу і переходять від рециркуляції до шляху протеасомної деградації, щоб послабити передачу сигналів рецепторів ГАМК_B [24]. Також відомо, що РКС фосфорилує субодиниці R1 рецептора ГАМК_B, хоч сайт фосфорилування не був ідентифікований

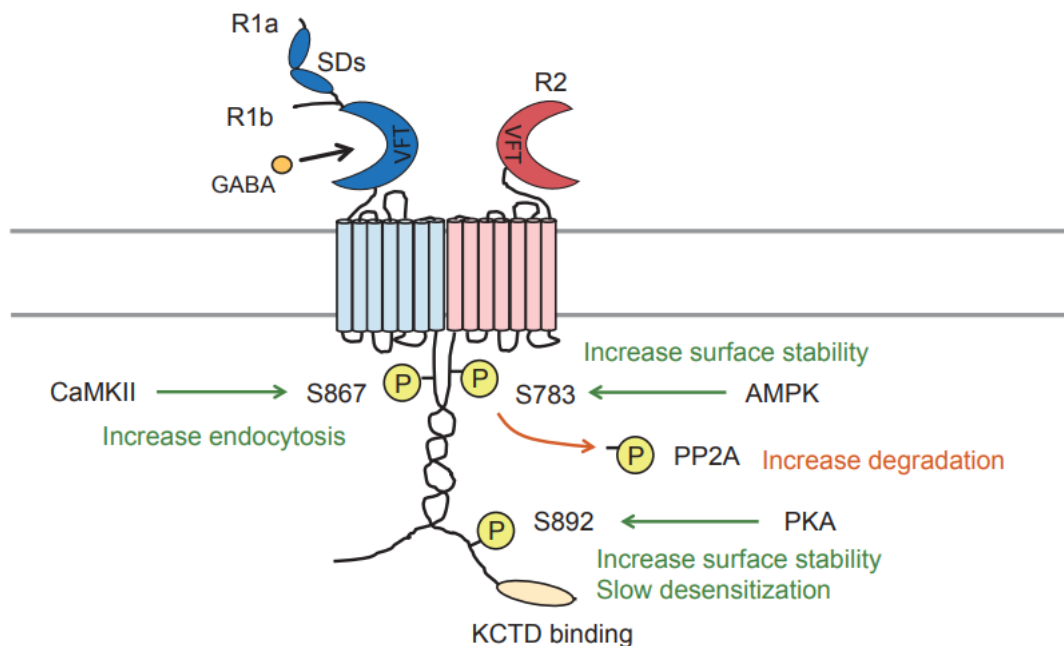


Рисунок 1.3 - Фосфорилування ГАМК_B-рецепторів та їх функціональна модуляція

Наразі було ідентифіковано п'ять сайтів фосфорилування: серин 867 (S867) і S917/923 на субодиниці R1 і S783 і S892 на субодиниці R2. Кальцій/кальмодулін-залежна протеїнкіназа II (CaMKII) фосфорилує S867 на субодиниці R1 і сприяє динамін-залежному рецепторному ендоцитозу. Було виявлено, що 5ВAMP-залежна протеїнкіназа (АМПК) фосфорилує S917/923 на субодиниці R1 і S783 на субодиниці R2. Фосфорилування S892 за допомогою РКА підвищує стабільність клітинної поверхні рецептора ГАМК_B, сприяє збиранню білка, що містить домен тетрамеризації калієвих каналів (KCTD) 12

(KCTD12) з субодиниці R2, і послаблює спричинену KCTD12 десенсибілізацію [25].

Порушення регуляції рецепторів ГАМК_B лежить в основі зміненої нейротрансмісії при багатьох неврологічних розладах. Протеїн фосфатаза 2A (PP2A) бере участь у дефосфорилуванні та подальшій інтерналізації ГАМК_B в моделях залежності та депресії. Було показано, що PP2A безпосередньо пов'язується з ГАМК_{BR} через певну серію амінокислот, розташованих у С-кінцевому домені субодиниці ГАМК_{BR1}. Порушення цієї взаємодії ГАМК_{BR1}/PP2A, зменшує дефосфорилування p-S783 на субодиниці ГАМК_{BR2} [26].

Інше дослідження показало, що негативний досвід у мишей, такий як вплив удару стопи (FsE), викликає гіперактивність нейронів латеральної габенули (LHb) і симптоми, схожі на депресію. Це відбувається разом із підвищеною активністю протеїн фосфатази 2A (PP2A), відомого регулятора рецептора ГАМК_B (ГАМК_{BR}) і поверхневої експресії каналу калієвого ректифікуючого внутрішнього білка G (GIRK). LHb кодує аверсивні сигнали, а її аберантна активність сприяє виникненню симптомів, схожих на депресію. Відповідно, FsE запускає інтерналізацію ГАМК_{BR1} і GIRK2, що призводить до швидкого і стійкого ослаблення ГАМК_B-активованих GIRK-опосередкованих (ГАМК_B-GIRK) струмів. Фармакологічне пригнічення PP2A відновлює як функцію ГАМК_B-GIRK, так і збудливість нейронів. Як наслідок, інгібування PP2A полегшує симптоми, схожі на депресію, після FsE. Таким чином, пластичність ГАМК_B-GIRK в LHb являє собою клітинний субстрат для аверсивного досвіду. Крім того, його відміна інгібуванням PP2A може забезпечити новий терапевтичний підхід для полегшення симптомів депресії при розладах, які характеризуються гіперактивністю LHb [33].

PP2A може безпосередньо асоціюватися з короткою пептидною послідовністю в С-кінцевому домені субодиниці ГАМК_{BR1} і ГАМК_{BR} і PP2A знаходяться в безпосередній близькості в нейронах гризунів. Цю взаємодію PP2A- ГАМК_{BR} можна регулювати внутрішньоклітинним Ca²⁺. Нарешті, пептид, який потенційно зменшує залучення PP2A до ГАМК_{BR} і, таким чином,

обмежує дефосфорилування рецепторів, збільшує величину індукованих баклофеном струмів GIRK. Таким чином, обмеження PP2A-залежного дефосфорилування ГАМК_{BR} може бути корисною стратегією для підвищення сигналізації рецепторів для лікування захворювань [34].

Інше відкриття свідчить про те, що Кальциневрин (CaN) може опосередковувати дефосфорилування субодиниць ГАМК_A, за допомогою якого інгібування ГАМК_A сприяє подальшій гіперзбудливості нейронів після судом. У цьому дослідженні вони характеризують зміни активності CaN, експресії білка та фосфорилування ГАМК_A в гіпокампі після того, як каїнова кислота індукувала епілептичний статус. Вестерн-блот-аналіз продемонстрував залежне від часу збільшення активності CaN і експресії білка, а також зниження регуляції фосфорилування ГАМК_A, індукованого епілептичним статусом. Було показано, що ці зміни мають різні реакції на FK506 (інгібітор CaN), з ослабленням активності CaN та експресії його білка та пригніченням дефосфорилування ГАМК_A. Це підвищує ймовірність того, що CaN відіграє важливу роль в епілептогенезі через дефосфорилування ГАМК_A, і що інгібітор CaN, такий як FK506, може мати клінічний потенціал у лікуванні рефрактерних судом [27].

1.5. Роль ГАМК рецепторів у клітинному циклі

Типовий еукаріотичний клітинний цикл містить кілька окремих фаз, які протікають упорядковано — фаза не може розпочатися без завершення попередньої. Чотири фази клітинного циклу — це фази G1 (G для розриву), S (синтез), G2 і M (мітоз) (Рис. 3.1). Фази G1, S і G2 разом складають інтерфазу. Вміст ДНК клітини у фазі G1 становить 2N (N – кількість хромосом), також відомий як диплоїд, тоді як вміст ДНК клітини у фазі G2 становить 4N (тетраплоїд). Вміст ДНК клітини у фазі S коливається від 2N до 4N залежно від стадії реплікації. М-фаза, у свою чергу, складається з двох процесів: мітозу, при якому хромосоми клітини розподіляються порівну між двома дочірніми

клітинами, і цитокінезу (або поділу клітини), при якому цитоплазма клітини ділиться навпіл, утворюючи дві різні дочірні клітини. клітини. Як правило, кількість часу, необхідного для одноклітинного циклу в клітинах людини, що активно проліферують в культурі, становить 24 години. З них фаза М займає приблизно 1 годину, а інтерфаза займає решту 23 годин.

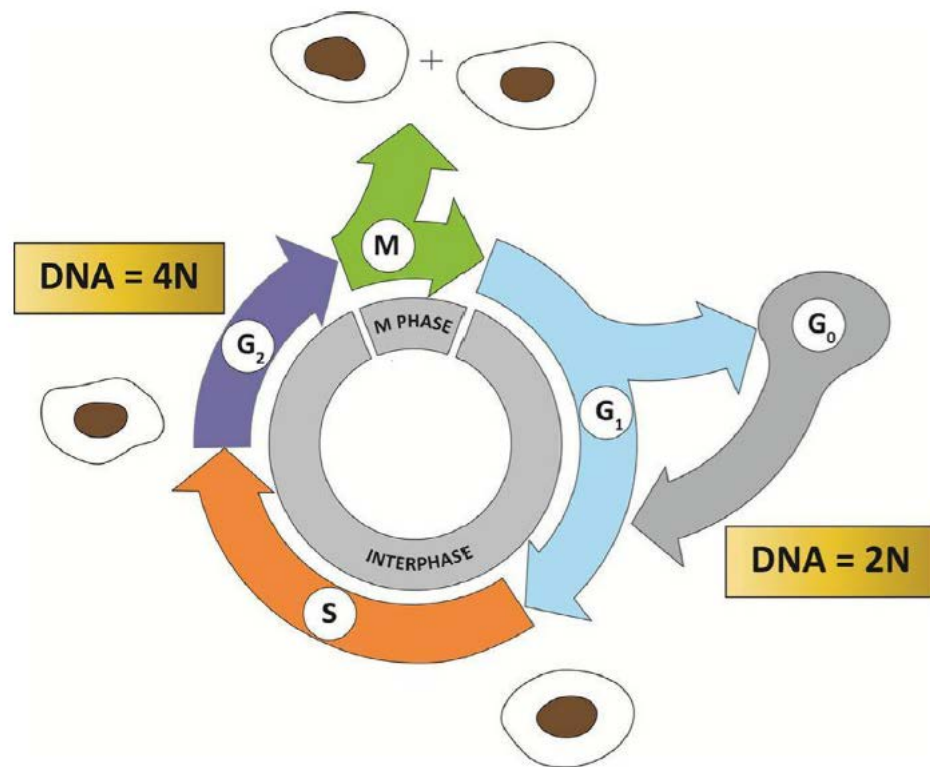


Рисунок 3.1 - Фази клітинного циклу

Клітинний цикл починається у фазі G₁ диплоїдної клітини (вміст ДНК = 2N; N — кількість хромосом). Після завершення реплікації ДНК у фазі S клітина переходить у фазу G₂ і має вдвічі більшу кількість ДНК (4N), ніж початкова клітина. Далі слідує мітоз (M) і поділ клітини, що призводить до утворення двох диплоїдних дочірніх клітин. Клітини або в мітозі, або в клітинному поділі (також званому цитокінезом) знаходяться в M-фазі, тоді як клітини в інших трьох фазах (G₁, S і G₂) знаходяться в інтерфазі. Час, протягом якого клітина проводить на кожній фазі, відрізняється залежно від типу клітини і не відображається в масштабі [35].

На додаток до чотирьох фаз клітинного циклу, перерахованих вище, одна фаза, яка знаходиться поза межами клітинного циклу, називається фазою G0 (0 для нуля). Клітини в цій фазі перебувають у фазі спокою, що часто є результатом їхнього виходу з фази G1 клітинного циклу. Як правило, клітина переходить у фазу G0, якщо середовище не сприяє прогресуванню клітинного циклу, як-от у разі позбавлення необхідних поживних речовин або факторів росту, або якщо клітина досягла повністю диференційованого стану, такого як гепатоцити або нейрони. У цих умовах клітину іноді називають у стані спокою. Крім того, клітина може перейти у фазу G0 і стати старіючим через пошкодження ДНК або стирання теломер. Це часто є альтернативою самознищенню пошкодженої клітини шляхом апоптозу.

У фазі М мітоз починається, коли ДНК конденсується у видимі хромосоми, з подальшим поділом хромосом на два однакові набори. Цитокінез - це остання фаза мітозу, коли дві дочірні клітини відокремлюються, кожна з ядром і цитоплазматичними органелами. Мітоз починається з руйнування ядерної мембрани з подальшою конденсацією хромосом і відділенням центросом (профаза). Це супроводжується утворенням мітотичних веретен, до яких одним кінцем прикріплені центросоми, а іншим кінцем — кінетохор — білкова структура, розташована біля центромер мітотичних хромосом (прометафаза) або поблизу них. У цей момент кінетохори, які не прикріплені до мітотичних веретен, генерують сигнал «очікування», який затримує початок анафази, поки всі хромосоми не будуть належним чином приєднані та вирівняні. Цей сигнал також називається контрольною точкою мітозу або контрольною точкою складання веретена (SAC), яка задовольняється, коли всі хромосоми збираються в екваторіальній пластині (метафаза). Після цього відбувається поділ хромосом до протилежних полюсів (анафаза) і утворення нових ядерних мембран навколо дочірніх ядер і розкручування хромосом (телофаза), зрештою утворюючи борозну розщеплення, що призводить до утворення двох дочірніх клітин (цитокінез). Рис3.2 ілюструє різні стадії мітозу.

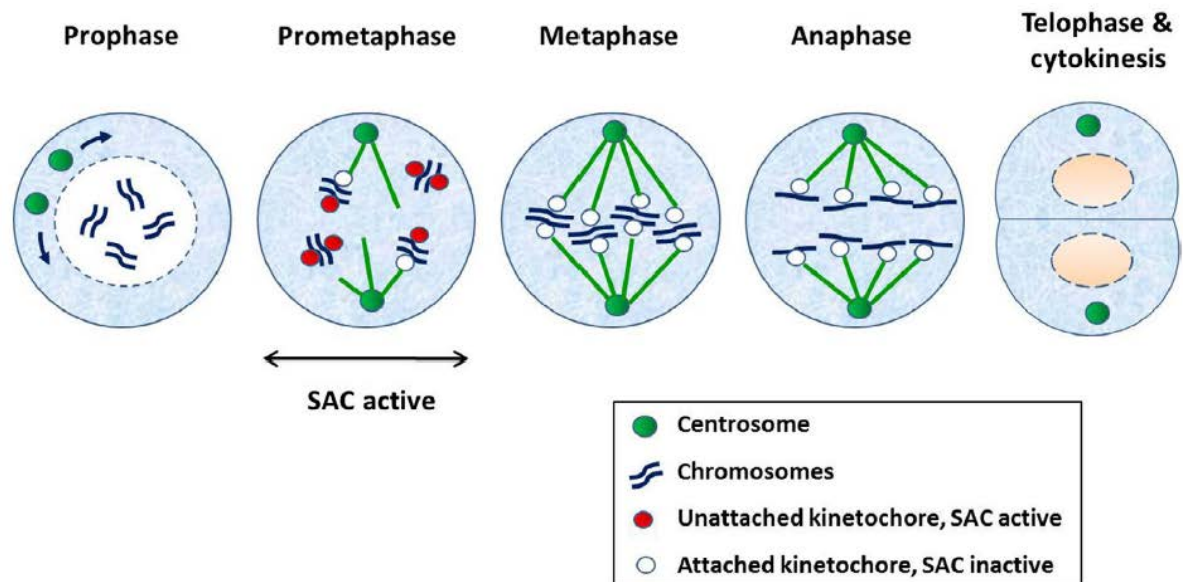


Рисунок 3.2 - Стадії мітозу. Проілюстровано різні фази мітозу [35].

Переміщення та стабільність функціональних каналів до поверхні мембрани є критичними для інгібуючої ефективності. Фосфорилування залишків у субодиницях GAMK_{AR} відіграє важливу роль у складанні, транспортуванні та стабільності клітинної поверхні GAMK_{AR} . Нейростероїди виробляються в мозку і є високоефективними алостеричними модуляторами струму, опосередкованого GAMK_{AR} . На цю алостеричну модуляцію нейростероїдами впливає фосфорильований стан GAMK_{AR} , який залежить від субодиниці, додаючи тимчасову та регіональну мінливість нейростероїдної відповіді. Можливі зв'язки між дією нейростероїдів, фосфорилуванням і торгівлею GAMK ще потрібно дослідити, але потенційні нові терапевтичні цілі можуть існувати для численних неврологічних і психологічних розладів, які пов'язані з коливаннями рівнів нейростероїдів та експресією субодиниці GAMK_A [36].

Надмірне вивільнення глутамату при церебральній ішемії призводить до ексайтотоксичності та загибелі клітин. Хоча більшість досліджень зосереджені на зменшенні впливу глутаматергічної системи, трафік GAMK_{AR} також значно модифікується, що може посилити ці ефекти [37]. Дійсно, про зниження поверхневих рівнів GAMK_{AR} і посилення убіквітин-залежної

лізосомної деградації повідомлялося в моделі ішемії *in vitro* з депривацією кисню і глюкози (OGD) [38].

Епілепсія є поширеним і часто руйнівним неврологічним розладом, заснованим на вражаючому дисбалансі між збудливою та гальмівною активністю. Тривалі безперервні напади (епілептичний статус, SE) у тварин і людей можуть спричинити розвиток скроневої епілепсії (TLE). Повідомлялося про зміни в торгівлі та експресії ГАМК_{AR} у пацієнтів і тваринних моделей SE та TLE [39]. Спостерігалися збільшення та зниження експресії ГАМК_{AR}, обидва з яких залежать від конкретних субодиниць і досліджуваного періоду часу епілептогенезу. Вважається, що втрата ГАМК_{AR} є одним із механізмів, що лежить в основі фармакорезистентності до бензодіазепінів. Крім того, дефосфорилування ГАМК_{AR} було причетним до втрати цих рецепторів під час SE. Зокрема, індукція SE пілокарпіном призводила до зниження РКС-опосередкованого фосфорилування залишків β3 S408/S409. Це дефосфорилування посилювало зв'язування з AP2, що призвело до ендоцитозу рецепторів під час SE [40]. Крім того, інші звіти припускають, що індукований кайнатом і пілокарпіном SE призводить до NMDAR-залежного збільшення активності та експресії CaN, що призводить до дефосфорилування β2/3 субодиниць ГАМК_{AR}. Чи призвів цей статус фосфорилування також до змін у поверхневій експресії, не досліджували.

Хоча ліганди, такі як бензодіазепіни, можуть мати клінічно важливе застосування, є суттєві докази ролі ГАМК_{AR} у регулюванні властивостей звикання до наркотиків. Підвищення рівнів BDNF після відміни кокаїну призводить до зниження ГАМКергічного інгібування та зниження поверхневої експресії ГАМК_{AR}, водночас із полегшенням індукованого активністю LTP. Ці ефекти були опосередковані сигнальним шляхом BDNF–TrkB–PP2A, що також призвело до зменшення фосфорильованих субодиниць β3. Вважається, що ці ефекти лежать в основі змін поведінки після відміни кокаїну [41]. Повідомляється, що застосування BDNF призводить до тривалого зниження ГАМК_{AR} -опосередкованих струмів через

опосередковане PRIP1/2 і PP2A дефосфорилування β3 S408/S409 [42], але чи застосовуються подібні механізми тут, ще належить побачити.

Було також виявлено, що хронічний вплив етанолу призводить до змін асоціації PKCγ з субодинами ГАМК_{AR}, зі зменшенням асоціації субодинами α1 і посиленням асоціації субодинами α4. Зменшення зв'язування PKCγ-α1 корелювало зі збільшенням субодинами α1 в везикулах, вкритих клатрином [43]. Крім того, інгібування PKCγ (але не PKCβ) запобігало опосередкованим етанолом модуляціям експресії субодинами α1 і α4. Цікаво, що фосфорилування PKC α4 на S443 збільшує кількість рецепторів на поверхні. Залишається з'ясувати, чи можна модулювати цей сайт за допомогою введення етанолу.

1.6. Селективні інгібітори ГАМК рецепторів та механізм їх дії

Інгібітори гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК) або антагоністи ГАМК — це препарати, які пригнічують дію ГАМК, первинного гальмівного нейромедіатора центральної нервової системи. Вони переважно працюють на рецептори ГАМК. У той час як рецептори ГАМК_A є іонотропними рецепторами, які відкривають хлоридні канали, рецептори ГАМК_B є метаботропними рецепторами, пов'язаними з G-білком. Підтипи рецепторів також можна диференціювати на основі їхньої селективності до агоністів і антагоністів: рецептори ГАМК_A антагонізовані бікукуліном і нечутливі до баклофену, тоді як рецептори ГАМК_B агонізовані баклофеном і нечутливі до бікукуліну. Ефективність більшості антагоністів ГАМК_A-рецепторів переважно не залежить від складу субодинами рецепторів, на відміну від агоністів ГАМК_A-рецепторів [44].

Приклади антагоністів рецепторів ГАМК_A включають флумазеніл, бікукулін, пікротоксин/пікротоксин, габазін, сурамін, сепранолон, саліциліденсаліцилгідрозид (SCS), білобалід, RU5135 та 4-(3-біфеніл-5-(4-3-

піперидил) ізоксазол (3-біфеніл-4-ПІОЛ) [44]. Приклади антагоністів ГАМК_C-рецепторів включають 1,2,5,6-тетрагідропіридин-4-метилфосфінову кислоту (ТФМПА) (Рис.4.1) [28].

Приклади антагоністів рецептора ГАМК_B включають 4,5,6,7-тетрагідрізоксазоло[5,4-с]піридин-3-ол (ТНІР) [28].

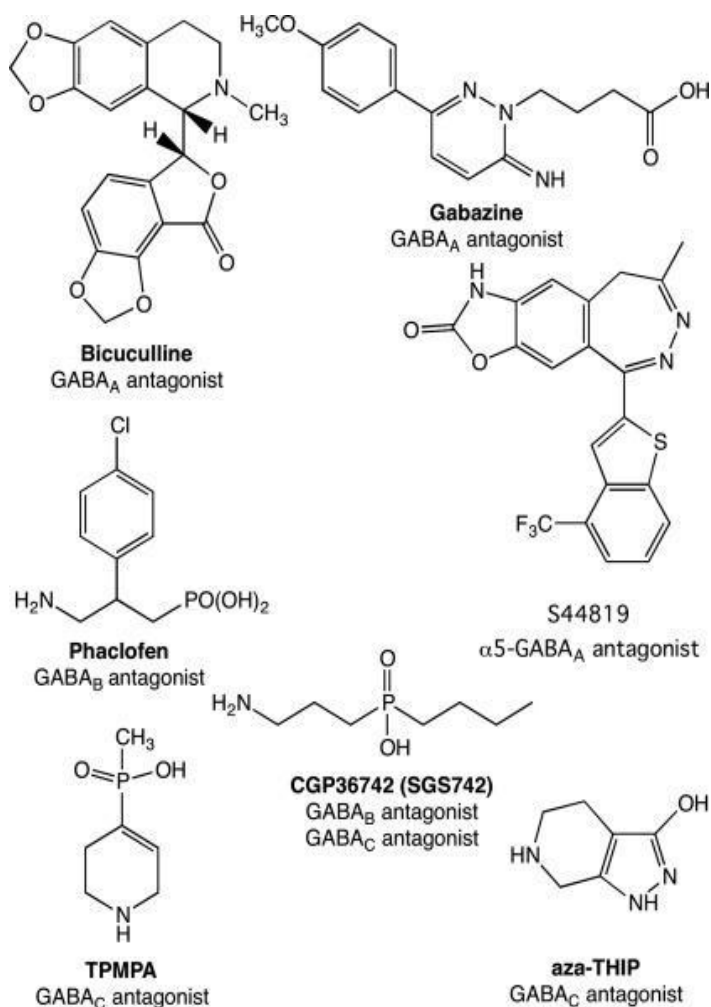


Рис 4.1 - Антагоністи, які розрізняють три основні класи ГАМК-рецепторів [45]

Механізм дії антагоністів ГАМК-рецепторів залежить від самого препарату. Бікукулін є конкурентним антагоністом рецепторів ГАМК_A; він зв'язується з рецепторами ГАМК_A і таким чином пригнічує зв'язування ГАМК. Пікротоксин, активний компонент пікротоксину, діє як неконкурентний антагоніст рецепторів ГАМК_A, зв'язуючись з іонофорами ГАМК [46]. Пікротоксин також діє на рецептори ГАМК_C, рецептори гліцину

та 5-HT₃, зв'язуються в області пор цих ліганд-керованих іонних каналів.[44] Габазин діє як конкурентний антагоніст рецепторів ГАМК_A [47]. Саліциліденсаліцилгідрозид (SCS) діє як інгібітор активації рецепторів ГАМК_A, що містять бета-1 субодиницю [48]. RU5135, похідне стероїдів, діє як конкурентний антагоніст із загальним місцем дії, як бікукулін, але є набагато ефективнішим, ніж бікукулін. RU5135 також діє як антагоніст гліцину [47] 3-біфеніл-4-ПЮЛ діє як селективний антагоніст рецептора ГАМК_A [49]. Сурамін є конкурентним антагоністом, селективним до рецепторів ГАМК_A, зокрема до рецепторів альфа-1-бета-2-гамма-2 ГАМК_A. Сурамін також є неселективним антагоністом пуринаргічних рецепторів [50].

Флумазеніл діє як специфічний антагоніст бензодіазепінів на рецептори ГАМК_A. Однак дослідження показали, що флумазеніл також має часткову позитивну алостеричну модулюючу активність щодо рецепторів ГАМК_A, що містять субодиницю альфа-6 [51]. Деякі дослідження показують, що дія флумазенілу може змінюватися в залежності від наявності інших модуляторів рецепторів ГАМК_A. При прийомі в низьких дозах і в присутності бензодіазепіну флумазеніл діє як низькоефективний антагоніст ГАМК_A -рецепторів. З іншого боку, при введенні у високих дозах або в присутності агоніста ГАМК_A, який діє на місці, відмінному від бензодіазепінового, флумазеніл діє як частковий агоніст рецептора ГАМК_A з низькою ефективністю [52].

1.7 Клінічна дія ефекторів ГАМК рецепторів

Антагоністи рецепторів ГАМК виробляють судомну і стимулюючу дію і в основному використовуються в дослідницьких цілях. Наприклад, бікукулін і габазин часто використовуються для функціонального розсічення компонентів рецептора ГАМК_A в нейронах. Ці антагоністи ГАМК-рецепторів

діють як селективні підтипу сполуки та допомагають вивчати поведінкові ефекти різних підтипів рецепторів ГАМК_A [48].

Не всі антагоністи рецепторів ГАМК_A виклакають судоми, наприклад, препарат білобалід, отриманий з гінкго білоба. Білобалід натомість діє як протисудомний засіб і нейропротектор, зменшуючи вивільнення L-глутамату та зменшуючи збудження, а також пригнічуючи синтез ГАМК через інгібування глутаматдекарбоксилази [44].

Деякі антагоністи ГАМК-рецепторів, такі як флумазеніл, використовуються для лікування передозування бензодіазепінів та усунення седативних ефектів бензодіазепінів, пов'язаних із загальною анестезією. Флумазеніл є антагоністом рецептора бензодіазепіну ГАМК_A, який запобігає зв'язуванню бензодіазепінів із сайтом зв'язування бензодіазепінів на ГАМК_A-рецепторах і запобігає припливу іонів хлориду і, як наслідок, гіперполяризації, таким чином запобігаючи ГАМК-ергічні інгібуючі ефекти [53]. Таким чином, флумазеніл є антидотом при підозрі на передозування бензодіазепінами або під час процедур, які використовують бензодіазепіни як анестезуючий засіб. Флумазеніл також може бути корисним для лікування бензодіазепінової залежності та лікування синдрому відміни бензодіазепінів. Було показано, що він полегшує стійкі симптоми відміни, зменшує тягу до бензодіазепінів і зменшує частоту рецидивів після детоксикації [52].

Були проведені подальші дослідження клінічних показань флумазенілу, в одному з яких було виявлено, що флумазеніл може покращувати ознаки хвороби Паркінсона [54]. Існує також певний інтерес до використання антагоністів ГАМК-рецепторів, таких як флумазеніл, для лікування ідіопатичної гіперсомнії, рідкісного розладу гіперсомнолентності, який можна відрізнити від нарколепсії за відсутністю швидких розладів сну. Враховуючи, що рецептори ГАМК_A регулюють сон і неспання, Yue et al. припустив, що надлишок сигналізації ГАМК може бути відповідальним за ідіопатичну гіперсомнію, і, таким чином, флумазеніл може лікувати цей стан. Вони виявили, що флумазеніл покращує психомоторну пильність і

сонливість у всіх пацієнтів спостерігається приблизно через 2 години після введення [55].

Сурамін — це протипаразитарний препарат, який використовується для лікування африканського трипаносомозу або сонної хвороби. Однак дослідження показали, що сурамін може використовуватися при лікуванні аутизму шляхом нормалізації гіперактивної реакції осі гіпоталамус-гіпофіз-наднирники (НРА) шляхом антагонізації рецепторів ГАМК_A [50].

Одне дослідження показало, що сепранолон, антагоніст стероїдів, що модулює рецептори ГАМК-А до метаболіту прогестерону алопрегнанолону, значно знижував негативний настрій у жінок з передменструальним дисфоричним розладом [56].

Враховуючи повний спектр клінічних застосувань антагоністів рецепторів ГАМК, при застосуванні цих препаратів важливою є міжпрофесійне спілкування та координація догляду. Наприклад, лікарі, медсестри, фармацевти та інші медичні працівники повинні знати про лікування передозування бензодіазепінами флумазенілом. Однак ефекти флумазенілу непостійні, і не всі пацієнти можуть реагувати. Крім того, анестезіологи несуть значну відповідальність за те, щоб бути добре обізнаними з антагоністами рецепторів ГАМК, оскільки вони можуть бути використані для скасування ефектів анестезії.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Розділ 2. Матеріали і методи.

2.1 Матеріали дослідження.

Для пошуку можливих сайтів зв'язування ГАМК_b рецепторів з PP2A в роботі було використано ряд біоінформаційних та структурно-біологічних баз даних (зокрема UniprotKB/SwissProt та UniProt/TrEMBL), в клітинах людини та рослин.

Для аналізу амінокислотних послідовностей протеїнфосфатаз було використано BLAST_{Tr} пошук рослинних гомологів в базі даних UniprotKB.

2.2 Біоінформаційний пошук і аналіз доменних структур.

На основі даних літератури, назв відповідних генів та аналізу баз даних RCSB PDB було виконано пошук матричних структур ГАМК рецептора та PP2A людини. Метою даного аналізу є аналіз амінокислотного складу даних сайтів зв'язування з інгібіторами та білками для реконструкції комплексу білок-інгібітор.

Пошук рослинних гомологів здійснювали на підставі алгоритму BLAST_{Tr} і застосуванням наступних параметрів: вагова матриця - BLOSUM62, число очікуваних збігів у випадковою вибіркою із порогом $E = 10$ при активній фільтрації низькоструктурованих ділянок і фрагментів вирівнювань, що містять гепи при використанні баз даних UniprotKB і GenBank.

Первинну вибірку послідовностей гомологів виконували на підставі ваги вирівнювань, а також відсоткових показників ідентичності, подібності і наявності гепів.

2.3 Аналіз доменної архітектури та структури протеїнфосфатаз

Для оцінки потенційної специфічності та доменної архітектури рослинних протеїнфосфатаз виконували профільний аналіз і визначали межі каталітичних доменів досліджуваних білків із застосуванням мережевого інструменту SMART7 (www.smart.embl-heidelberg.de) та на підставі даних статей UniProtKB, регулюючи відбір та аналіз за унікальними структурами каталітичних доменів PP2A (SMART: SM000156), PTPc (SMART: SM00194), DSPc (SM000195).

Аналіз потенційної функції рослинних гомологів виконували на підставі моделювання білок-білкових взаємодій проти анотованих протеїнфосфатаз *H. sapiens* і *A. thaliana*, що входять в ключові сигнальні каскади із застосуванням інструменту STRING 10.5 (<http://string-db.org/>).

2.4 Відбір та аналіз якості матричних структур протеїнфосфатаз людини як потенційних матриць для моделювання

Шаблонні структури протеїнфосфатаз були вибрані на основі методів BLAST, тоді як більш дистанційно віддалені послідовності обирались за допомогою методу PSI-BLAST з бази даних RCSB Protein Data Bank. Відбір потенційних матриць був оснований на повноті структур (порівняно з відповідними амінокислотними послідовностями взятими з бази даних UniProtKB, аналізу сиквенсів PP за трьома показниками: ідентичність, схожість, гепи), якості самої моделі (в Å, визначеної за роздільною здатністю) та особливостях взаємодії з іншими субодиницями протеїнфосфатаз або специфічними інгібіторами, що визначають потенційні сайти зв'язування з інгібіторами.

Для подальшого дослідження за допомогою структурно-молекулярних методів (молекулярного моделювання та докінгу) з мультимерних кристалів було залишено всього один гомологічний рослинним протеїнфосфатазам

ланцюг при використанні текстового редактору AkelPAD (цей редактор дотримується форматування і не змінює його на формат операційної системи). Наступна підготовка молекули дала можливість перетворити сиру структуру PDB в графічну модель, яка відображала всі атоми молекули і повністю підготувала модель білка, забезпечуючи точність всіх наступних симуляцій молекулярного моделювання. Зокрема етап підготовки включав у себе видалення всієї води PDB-структур і додавання атомів водню у матричну структуру білку, оцінку стану іонізації для кожної функціональної групи та відбудову бічних радикалів амінокислот, оптимізацію геометрії воднів та визначення водневих зв'язків. Підготовлені структури протеїнфосфатаз були збережені у повноатомному форматі для подальшого використання при дослідженні молекулярної механіки та динаміки комплексів PP-інгібітор, а також нормалізації зображення.

2.5 Пошук відомих інгібіторів PP2A та ГАМК

За результатами проведеного пошуку в базах даних Google Patents, PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL було відібрано 126 речовин з селективною дією по відношенню до PP2A та 503 речовини, специфічних до ГАМК рецептора. Зведену групу потенційних інгібіторів було перевірено згідно з правилами драг-подібності, а також на наявність певних фрагментів - можливих фармакофорів.

2.6 Біоінформатичні інструменти

Для роботи з амінокислотними послідовностями використовували міжнародну базу даних UniProt (Universal Protein Resource): записи, відмічені як куровані, зокрема послідовність субодиниць рецептора ГАМКВ Homo sapiens. Для роботи з просторовими структурами білків використовувалась база даних Protein Data Bank (PDB) Просторову структуру PP2A отримували з бази даних хімічних сполук та сумішей PubChem. Проведення пошуку та

аналіз сайтів взаємодії PP2A з рецептором ГАМКВ, проводили за допомогою вебсервісу ZINC та eMolecules.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Пошук та аналіз послідовностей ГАМК рецептора та PP2A

Результати аналізу таких он-лайнних баз даних, як «UniProtKB/SwissProt» та «UniProtKB/TrEMBL» дозволили знайти та проаналізувати чисельну групу первинних послідовностей ГАМК рецептора та питеїнофосфатази PP2A як прокаріотичного, так і еукаріотичного походження. В результаті ґрунтуючись на представлених в літературі з баз даних були відібрані відповідні повні амінокислотні послідовності мішеней людини.

Подальший BLASTp-пошук рослинних гомологів в базі даних UniProtKB, був виконаний проти повних амінокислотних послідовностей і послідовностей каталітичних доменів ГАМК рецептора та PP2A.

В результаті проведеного аналізу було виявлено рослинні ортологи з *A. thaliana*. Випадки багаторазового депонування виявляли на підставі порівняння координат локусів генів відповідних білків. Вихідну вибірку амінокислотних послідовностей коригували на підставі ваги вирівнювань, а також відсоткових показників ідентичності, подібності і наявності гепів використовуючи можливості інструменту BLASTp.

Таблиця 3.1 – Результати пошуку мішеней у протеомних базах даних

	Анотовано	Неанотовано	Відібрано
ГАМК рецептор	970 proteins	64, 224 proteins	319 <i>H.sapiens</i> 44 <i>A.thaliana</i>
PP2A	982 proteins	29, 486 proteins	278 <i>H.sapiens</i> 147 <i>A.thaliana</i>

В результаті проведеного аналізу близько 800 сиквенсів було відібрано для подальшого дослідження за допомогою молекулярного моделювання ановані амінокислотні послідовності ГАМК рецептора та PP2A людини і ортологів з рослин.

3.2. Профільний аналіз доменної структури ГАМК рецептора та PP2A

Результати аналізу доменного складу та архітектури відібраних рослинних білків підтвердили наявність функціональних доменів ГАМК рецептора та PP2A рослинного походження, про що свідчить відповідність існуючим профілям і прихованим моделям Маркова (HMM), складеним на підставі порівняння низки послідовностей експериментально підтверджених еукаріотичних ГАМК рецептора та PP2A.

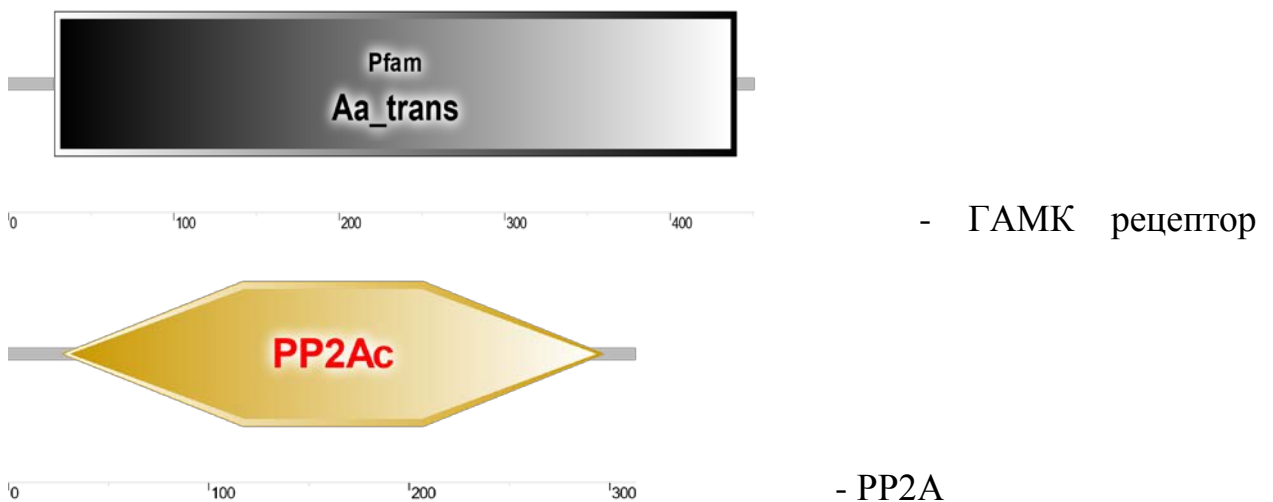


Рис.3.1 - Приклад відповідної доменної структури ГАМК рецептора та PP2A у рослинних гомологів

3.3. Відбір та перевірка якості просторових структур ГАМК рецептора та PP2A встановлених експериментально

Було виконано пошук у базі даних RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) білків матриць з метою їх подальшого використання для реконструкції

просторової структури протеїнфосфатаз рослин методом *in silico*. Всього у RCSB PDB було знайдено 52-і матричні структури ГАМК рецептора та PP2A: з них більшу частину *H.sapiens* та вього 2 *A.thaliana*. Проведений аналіз амінокислотного складу відомих сайтів зв'язування з інгібіторами, білками та іншими партнерами може бути використаними для реконструкції комплексів білок-інгібітор.

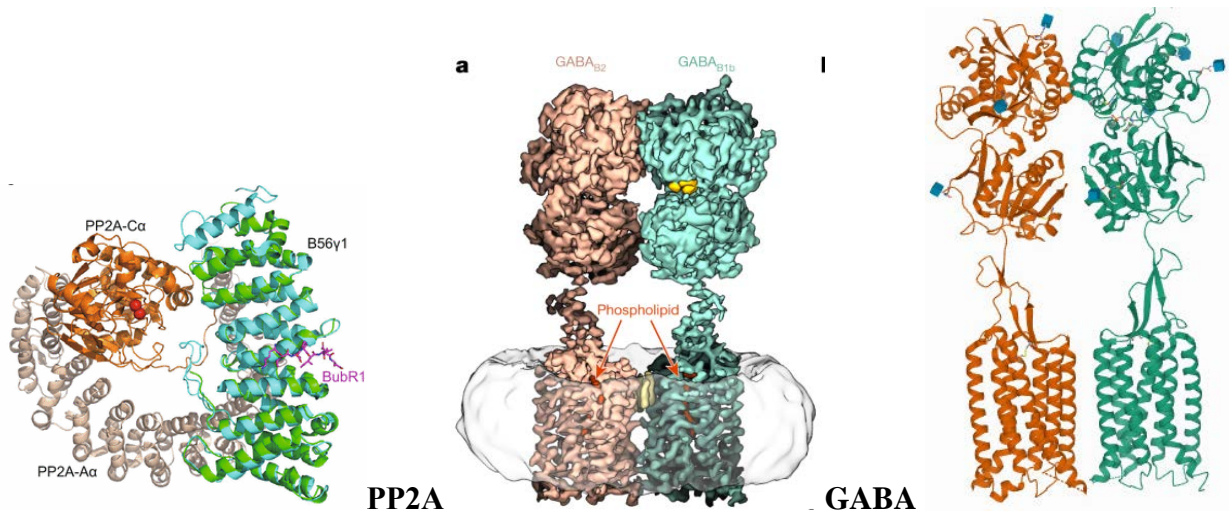
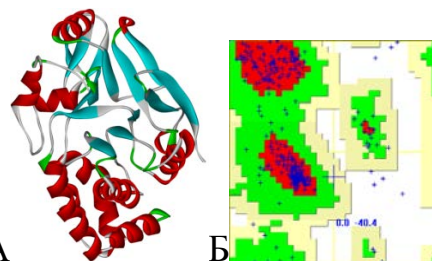


Рис. 3.2 - Приклад просторових структур мішеней відібраних для аналізу з бази даних RCSB PDB

В результаті аналізу 24 структур рецептору (PDB IDs: 5GWM, 4PAS, 5X9X, 2MG6, 2MFY, 2MFX, 6CGX, 6I0Q, 2MTU, 1SRZ, 2MTT, 2MTO, 6QZL, 6QB7, 6OCP, 7C7S, 7C7Q, 6W2X, 6VJM, 6UOA, 6UO9, 6UO8, 6M8S, 7EB2_) було відібрано дві структури 6UOA, 6UO9, тоді як для протеїнфосфатази зі 156 ти всього одна - 2IE4.



B Energy = -13978.089737 kcal/mol, Gradient= 0.099492

Рис.3.3 - Приклад аналізу просторової структури каталітичних субодиниць протеїнфосфатаз типу PP2A (A - 2IE4 (2.60 Å) та результати перевірки їх якості із застосуванням карт Рамачандрана.

Аналіз якості існуючих матричних структур на підставі таких показників як ідентичність, подібність, наявність дефектів структури, роздільна якість кристалографічно вирішених структур, показники кутів Ψ і χ (Ramachandran plot's), дозволив підібрати оптимальні шаблони для профільного моделювання *in silico* ряду протеїнфосфатаз.

3.4. Дослідження особливостей взаємодій на поверхні ГАМК рецептора

На основі даних літератури та відібраних комплексів було проведено аналіз амінокислотного складу сайтів зв'язування інгібіторів, активаторів та білків з ГАМК-рецептором, які можуть бути використаними для реконструкції комплексів ПФ – ГАМК.

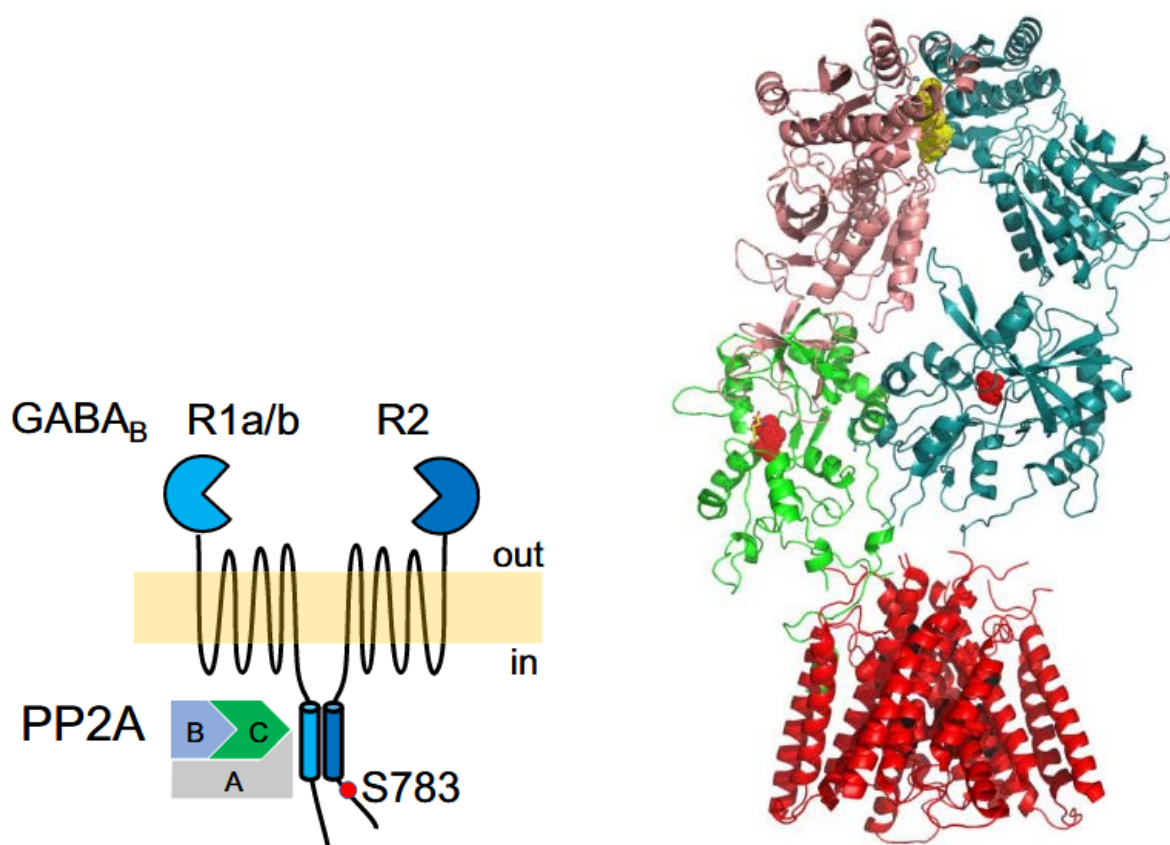


Рис.3.4 – Дослідження сайтів взаємодії на С-кінцевому домені GABA_B

Так окрім сайту дефосфорилювання S783 було встановлено чотири можливі сайти з позначеним цільовими та алостеричними сайтами. Структура іонного каналу пофарбована в червоний колір.

Також було проведено аналіз каталітичних субодиниць протеїнфосфатаза типу 2A з *A. thaliana* (UniProtKB: Q07099; SMART: SM00156) і структур відповідним рослинним гомологів з *N.tabacum*, *M.sativa*, *O.sativa subsp. japonica*, *Z.mays*, *T.aestivum*.

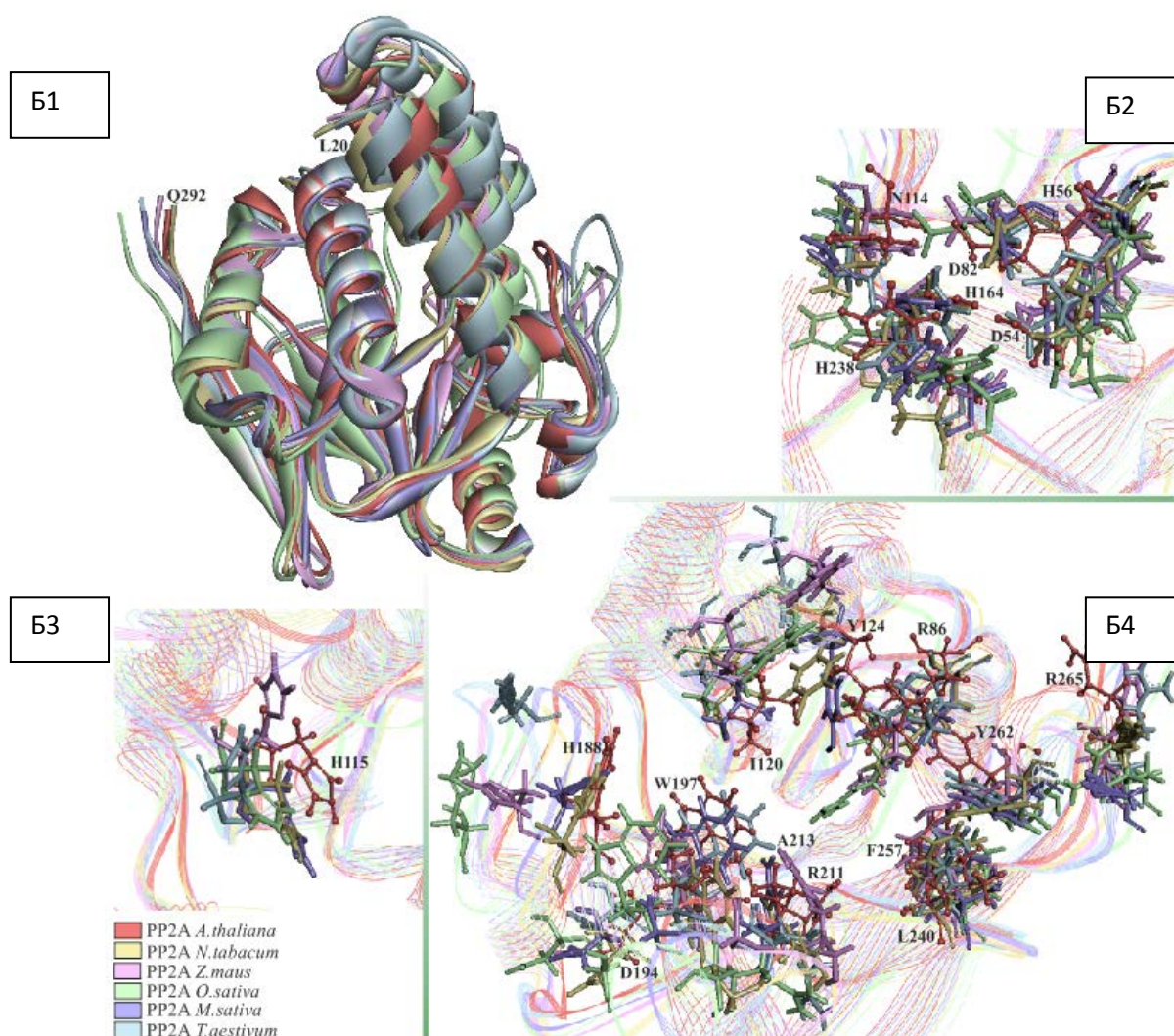


Рис.3.5 - Результати накладення просторової структури фосфатних доменів каталітичних субодиниць рослинних PP2A

3.5. Пошук та аналіз відомих інгібіторів ГАМК рецептора і PP2A

За результатами проведеного пошуку в базах даних Google Patents, PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL було відібрано 126 речовин з селективною дією по відношенню до PP2A та 503 речовини, специфічних до ГАМК рецептора. Зведену групу потенційних інгібіторів було перевірено згідно з правилами драг-подібності, а також на наявність певних фрагментів - можливих фармакофорів.

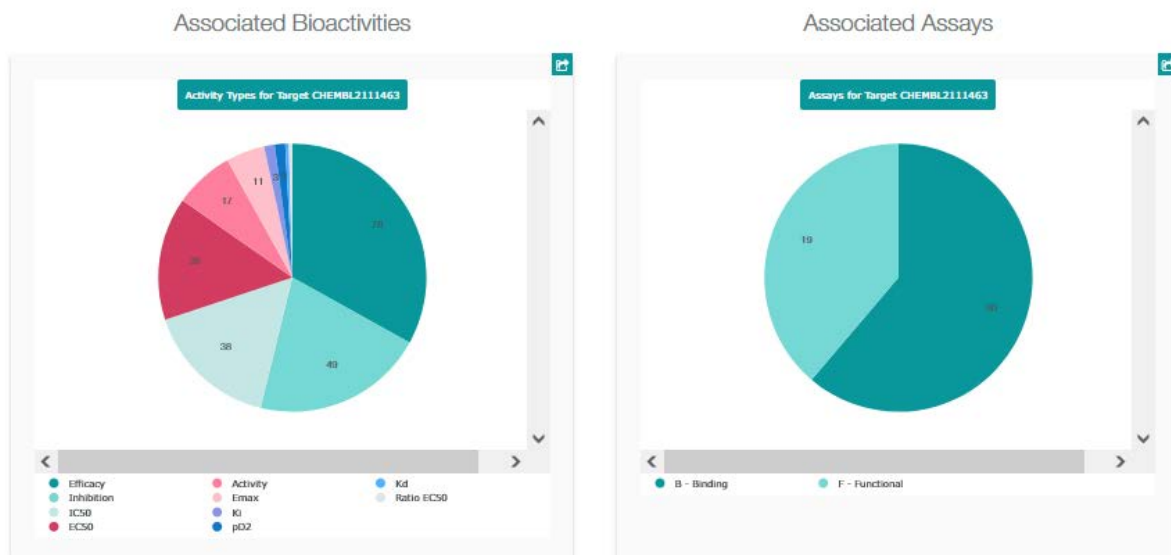


Рис. 3.6 – Приклад результатів аналізу інгібіторів ГАМК рецептора

Показано, що ліганд-білкова взаємодія із сайтами зв'язування в більшості випадків відбувається за участі іонів металів та молекул води. На підставі пошуку з використанням дескрипторів і аналізу можливих фармакофорів було створено бібліотеку моделей структур інгібіторів ГАМК рецептора і PP2A та підготовлені для подальшого молекулярного докінгу.

3.6. Реконструкція структури комплексів ГАМК рецептора і PP2A з потенційними інгібіторами

На основі побудованих фармакофорних моделей було проведено реконструкцію структури комплексу ГАМК-Б рецептора і PP2A з потенційними інгібіторами. В результаті віртуального скринінгу у сайти зв'язування на основі побудованих моделей було отримано бібліотеку нових потенційних інгібіторів ГАМК рецептора і PP2A.

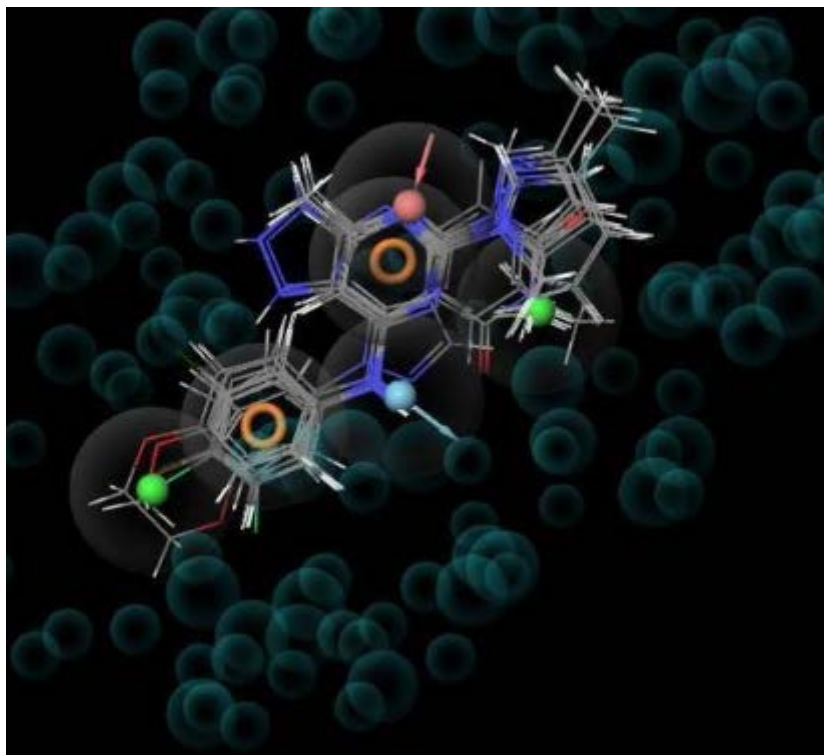


Рис. 3.7 - Приклад сполук, що відповідають фармакофорній моделі ГАМК рецептора. Сфери імітують атоми рецептора (синьо-зелені кульки).

В результаті даного дослідження було знайдено 295 сполук з селективною дією по відношенню до ГАМК рецептора та сайту фосфорилування PP2A.

ВИСНОВКИ

1. На основі пошуку та аналізу послідовностей ГАМК рецептора та PP2A було встановлено наявність рослинних гомологів даних мішеней, їх функції були підтверджені наявністю характерної доменної структури ГАМК рецептора та PP2A
2. Проведено відбір просторових структур ГАМК рецептора та PP2A встановлених експериментально та встановлено спільні риси цільових мішеней різного еволюційного походження.
3. В результаті дослідження особливостей взаємодій на поверхні ГАМК рецептора окрім сайту дефосфорилювання S783 було встановлено чотири можливі сайти для докінгу.
4. Аналіз відкритих хімічних баз даних показав наявність селективних та не специфічних інгібіторів ГАМК рецептора і PP2A.
5. Реконструкція структури комплексів ГАМК рецептора і PP2A з потенційними інгібіторами дозволила встановити 295 унікальних сполук.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition?. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(9), 715–727.
2. Johnston G. A. (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, 69(3), 173–198.
3. Sivilotti, L., & Nistri, A. (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 36(1), 35–92.
4. Bormann J. (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends in neurosciences*, 11(3), 112–116.
5. Bowery, N.G. (1989) GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 401–407
6. Johnston, G.A.R. (1996) GABAC receptors: relatively simple transmittergated ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 319–323#
7. Bormann J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 21(1), 16–19..
8. Steiger, J. L., & Russek, S. J. (2004). GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacology & therapeutics*, 101(3), 259–281.
9. Daniel, C., & Ohman, M. (2009). RNA editing and its impact on GABAA receptor function. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 6), 1399–1403.
10. Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *The Journal of biological chemistry*, 287(48), 40224–40231.
11. Baur, R., Minier, F., & Sigel, E. (2006). A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS letters*, 580(6), 1616–1620.
12. Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5), 331–343.

13. Wang M. (2011). Neurosteroids and GABA-A Receptor Function. *Frontiers in endocrinology*, 2, 44.
14. Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery.
15. Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., & Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological reviews*, 84(3), 835–867.
16. Pfaff, T., Malitschek, B., Kaupmann, K., Prézeau, L., Pin, J. P., Bettler, B., & Karschin, A. (1999). Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA(B)R1 receptor. *The European journal of neuroscience*, 11(8), 2874–2882.
17. Humphrey, S. J., James, D. E., & Mann, M. (2015). Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26(12), 676–687.
18. Browning, M. D., Endo, S., Smith, G. B., Dudek, E. M., & Olsen, R. W. (1993). Phosphorylation of the GABAA receptor by cAMP-dependent protein kinase and by protein kinase C: analysis of the substrate domain. *Neurochemical research*, 18(1), 95–100.
19. Moss, S. J., Doherty, C. A., & Huganir, R. L. (1992). Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the beta 1, gamma 2S, and gamma 2L subunits of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *The Journal of biological chemistry*, 267(20), 14470–14476.
20. Moss, S. J., Smart, T. G., Blackstone, C. D., & Huganir, R. L. (1992). Functional modulation of GABAA receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5070), 661–665.
21. McDonald, B. J., & Moss, S. J. (1997). Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein

- kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology*, 36(10), 1377–1385.
22. Moss, S. J., Gorrie, G. H., Amato, A., & Smart, T. G. (1995). Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature*, 377(6547), 344–348.
23. Kuramoto, N., Wilkins, M. E., Fairfax, B. P., Revilla-Sanchez, R., Terunuma, M., Tamaki, K., Iemata, M., Warren, N., Couve, A., Calver, A., Horvath, Z., Freeman, K., Carling, D., Huang, L., Gonzales, C., Cooper, E., Smart, T. G., Pangalos, M. N., & Moss, S. J. (2007). Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*, 53(2), 233–247.
24. Terunuma, M., Vargas, K. J., Wilkins, M. E., Ramírez, O. A., Jaureguiberry-Bravo, M., Pangalos, M. N., Smart, T. G., Moss, S. J., & Couve, A. (2010). Prolonged activation of NMDA receptors promotes dephosphorylation and alters postendocytic sorting of GABAB receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13918–13923.
25. Terunuma M. (2018). Diversity of structure and function of GABA_B receptors: a complexity of GABA_B-mediated signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 94(10), 390–411.
26. Li, X., Terunuma, M., Deeb, T. G., Wiseman, S., Pangalos, M. N., Nairn, A. C., Moss, S. J., & Slesinger, P. A. (2020). Direct Interaction of PP2A Phosphatase with GABA_B Receptors Alters Functional Signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(14), 2808–2816.
27. Wang, A., Chi, Z., Wang, S., Wang, S., & Sun, Q. (2009). Calcineurin-mediated GABA(A) receptor dephosphorylation in rats after kainic acid-induced status epilepticus. *Seizure*, 18(7), 519–523.

28. Chebib, M., & Johnston, G. A. (1999). The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 26(11), 937–940.
29. Zhang, D., Pan, Z. H., Awobuluyi, M., & Lipton, S. A. (2001). Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 22(3), 121–132.
30. Gavande, N., Kim, H. L., Doddareddy, M. R., Johnston, G. A., Chebib, M., & Hanrahan, J. R. (2013). Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Fluorescent and Biotinylated Antagonists of $\rho 1$ GABAC Receptors. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(4), 402–407.
31. Ng, C. K., Kim, H. L., Gavande, N., Yamamoto, I., Kumar, R. J., Mewett, K. N., Johnston, G. A., Hanrahan, J. R., & Chebib, M. (2011). Medicinal chemistry of ρ GABAC receptors. *Future medicinal chemistry*, 3(2), 197–209.
32. Morris, K. D., Moorefield, C. N., & Amin, J. (1999). Differential modulation of the gamma-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. *Molecular pharmacology*, 56(4), 752–759.
33. Lecca, S., Pelosi, A., Tchenio, A., Moutkine, I., Lujan, R., Hervé, D., & Mameli, M. (2016). Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. *Nature medicine*, 22(3), 254–261.
34. Li, X., Terunuma, M., Deeb, T. G., Wiseman, S., Pangalos, M. N., Nairn, A. C., Moss, S. J., & Slesinger, P. A. (2020). Direct Interaction of PP2A Phosphatase with GABA_B Receptors Alters Functional Signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(14), 2808–2816.
35. Yang, V. W. (2018). The Cell Cycle. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 197–219.

36. Comenencia-Ortiz, E., Moss, S. J., & Davies, P. A. (2014). Phosphorylation of GABA_A receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions. *Psychopharmacology*, *231*(17), 3453–3465.
37. Schwartz-Bloom, R. D., & Sah, R. (2001). gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry*, *77*(2), 353–371.
38. Arancibia-Cárcamo, I. L., & Kittler, J. T. (2009). Regulation of GABA(A) receptor membrane trafficking and synaptic localization. *Pharmacology & therapeutics*, *123*(1), 17–31.
39. Brooks-Kayal, A. R., Shumate, M. D., Jin, H., Rikhter, T. Y., & Coulter, D. A. (1998). Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nature medicine*, *4*(10), 1166–1172.
40. Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P. G., Coulter, D. A., & Moss, S. J. (2008). Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(2), 376–384.
41. Lu, H., Cheng, P. L., Lim, B. K., Khoshnevisrad, N., & Poo, M. M. (2010). Elevated BDNF after cocaine withdrawal facilitates LTP in medial prefrontal cortex by suppressing GABA inhibition. *Neuron*, *67*(5), 821–833
42. Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J. T., Jovanovic, J. N., Takenaka, K., Nakayama, K. I., Fukami, K., Takenawa, T., Moss, S. J., Nabekura, J., & Hirata, M. (2006). Modulation of GABA(A) receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. *The Journal of biological chemistry*, *281*(31), 22180–22189.

43. Kumar, S., Kralic, J. E., O'Buckley, T. K., Grobin, A. C., & Morrow, A. L. (2003). Chronic ethanol consumption enhances internalization of alpha1 subunit-containing GABAA receptors in cerebral cortex. *Journal of neurochemistry*, *86*(3), 700–708.
44. Johnston G. A. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British journal of pharmacology*, *169*(2), 328–336.
45. Hinton, T., & Johnston, G. A. R. (2018). GABA, The Major Inhibitory Neurotransmitter in the Brain. Reference Module in Biomedical Sciences.
46. Andrews, P. R., & Johnston, G. A. (1979). GABA agonists and antagonists. *Biochemical pharmacology*, *28*(18), 2697–2702.
47. Heaulme, M., Chambon, J. P., Leyris, R., Molimard, J. C., Wermuth, C. G., & Biziere, K. (1986). Biochemical characterization of the interaction of three pyridazinyl-GABA derivatives with the GABAA receptor site. *Brain research*, *384*(2), 224–231.
48. Thompson, S. A., Wheat, L., Brown, N. A., Wingrove, P. B., Pillai, G. V., Whiting, P. J., Adkins, C., Woodward, C. H., Smith, A. J., Simpson, P. B., Collins, I., & Wafford, K. A. (2004). Salicylidene salicylhydrazide, a selective inhibitor of beta 1-containing GABAA receptors. *British journal of pharmacology*, *142*(1), 97–106.
49. Frølund, B., Jensen, L. S., Storustovu, S. I., Stensbøl, T. B., Ebert, B., Kehler, J., Krosgaard-Larsen, P., & Liljefors, T. (2007). 4-aryl-5-(4-piperidyl)-3-isoxazolol GABAA antagonists: synthesis, pharmacology, and structure-activity relationships. *Journal of medicinal chemistry*, *50*(8), 1988–1992.
50. Luo, H., Wood, K., Shi, F. D., Gao, F., & Chang, Y. (2018). Suramin is a novel competitive antagonist selective to $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A over $\rho 1$ GABA_C receptors. *Neuropharmacology*, *141*, 148–157.
51. Hadingham, K. L., Garrett, E. M., Wafford, K. A., Bain, C., Heavens, R. P., Sirinathsingji, D. J., & Whiting, P. J. (1996). Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and

- characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. *Molecular pharmacology*, 49(2), 253–259.
- 52.Hulse, G., Kelty, E., Hood, S., Norman, A., Basso, M. R., & Reece, A. S. (2015). Novel Indications for Benzodiazepine Antagonist Flumazenil in GABA Mediated Pathological Conditions of the Central Nervous System. *Current pharmaceutical design*, 21(23), 3325–3342.
- 53.Hood, S. D., Norman, A., Hince, D. A., Melichar, J. K., & Hulse, G. K. (2014). Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. *British journal of clinical pharmacology*, 77(2), 285–294.
- 54.Ondo, W. G., & Hunter, C. (2003). Flumazenil, a GABA antagonist, may improve features of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 18(6), 683–685.
- 55.Rye, D. B., Bliwise, D. L., Parker, K., Trotti, L. M., Saini, P., Fairley, J., Freeman, A., Garcia, P. S., Owens, M. J., Ritchie, J. C., & Jenkins, A. (2012). Modulation of vigilance in the primary hypersomnias by endogenous enhancement of GABAA receptors. *Science translational medicine*, 4(161), 161ra151.
- 56.Bixo, M., Ekberg, K., Poromaa, I. S., Hirschberg, A. L., Jonasson, A. F., Andréén, L., Timby, E., Wulff, M., Ehrenborg, A., & Bäckström, T. (2017). Treatment of premenstrual dysphoric disorder with the GABA_A receptor modulating steroid antagonist Sepranolone (UC1010)-A randomized controlled trial. *Psychoneuroendocrinology*, 80, 46–55.